

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
16 septembre 2004 (16.09.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/078789 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

C08B 37/00, A61K

31/715, 35/74, C12P 19/04, C12R 1/22

Bruyères, F-93260 Les Lillas (FR). LASSALLE, Laurent [FR/FR]; 13, rue Anatole France, F-27780 Garennes Sur Eure (FR). PHILBE, Jean-Luc [FR/FR]; Impasse de la Grange Bahin, Les Brulés, F-27570 Acon (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/000330

(74) Mandataire : BURTIN, Jean-François; GEFIB, 55, rue Aristide Briand, F-923009 CEDEX LEVALLOIS-PERRET (FR).

(22) Date de dépôt international : 4 février 2003 (04.02.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(81) États désignés (national) : JP, KR, US.

(26) Langue de publication :

français

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SOLABIA (SA) [FR/FR]; 29, rue Delizy, F-93500 Pantin (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LECLERE, Sophie [FR/FR]; 34 A rue Saint Martin, F-28100 Dreux (FR). MOLINA, Jean-François [FR/FR]; 27, rue des

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL AGENT FOR STIMULATING THE RELEASE OF BETA-ENDORPHINS, COSMETIC AND/OR DERMATOLOGICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME AND USES THEREOF

(54) Titre : NOUVEL AGENT STIMULANT LA LIBERATION DES BETA-ENDORPHINES, COMPOSITIONS COSMETIQUES ET/OU DERMATOLOGIQUES EN CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to the field of essential goods, particularly the fields of cosmetics and pharmaceuticals and, more specifically, dermatology. In particular, the invention relates to novel active compounds which stimulate the release of  $\beta$ -endorphins by keratinocytes, consisting of a polysaccharide and/or a saccharide derivative comprising repeating saccharide units containing at least one rhamnose molecule which is fixed in a branched manner, said sequence preferably comprising mainly rhamnose. The invention also relates to the use of such polysaccharide compounds in order to stimulate the release of  $\beta$ -endorphins by keratinocytes. The invention further relates to cosmetic and/or pharmaceutical compositions, particularly dermatological compositions, containing the inventive active compound which may be used together with or in a mixture with one or more suitable pharmaceutical and/or cosmetic vehicles or excipients. The aforementioned compositions can be used, for example, to care for and/or treat the skin and/or skin appendages.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte au domaine des nécessités de la vie et plus particulièrement aux domaines de la cosmétologie, de la pharmacie et plus spécifiquement de la dermatologie. La présente invention a plus particulièrement pour objet de nouveaux composés actifs stimulant la libération de  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes, constitués d'un polysaccharide et/ou d'un dérivé saccharidique comportant des unités répétitives saccharidiques contenant au moins une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée, ladite séquence étant, de préférence, constituée majoritairement de rhamnose. La présente invention concerne également l'utilisation de tels composés polysaccharidiques pour stimuler la libération des  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes. La présente invention a également pour objet les compositions cosmétiques et/ou pharmaceutiques en particulier dermatologiques, qui contiennent ce composé actif, éventuellement en association ou en mélange avec un ou plusieurs excipients ou véhicules cosmétiques et/ou pharmaceutiques appropriés. De telles compositions trouvent une utilisation notamment pour les soins et/ou le traitement de la peau et/ou des phanères.

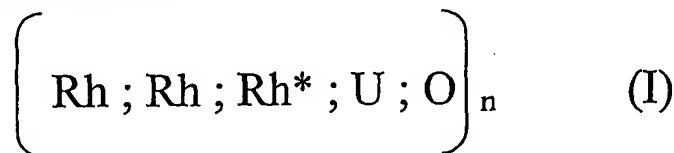
WO 2004/078789 A1

**Nouvel agent stimulant la libération des  $\beta$ -endorphines, compositions cosmétiques et/ou dermatologiques en contenant et leurs applications.**

La présente invention se rapporte au domaine des nécessités de la vie et plus particulièrement aux domaines de la cosmétologie, de la pharmacie et plus spécifiquement de la dermatologie.

La présente invention concerne des composés actifs stimulant la libération des  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes, comportant des séquences répétitives saccharidiques et contenant au moins une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée.

Plus précisément, l'invention a pour objet un polysaccharide et/ou un dérivé de celui-ci comportant des séquences répétitives saccharidiques, contenant au moins une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée, ladite séquence étant constituée, dans son ensemble, majoritairement de rhamnose. Un tel polysaccharide et/ou dérivé est caractérisé en ce qu'il est formé d'éléments répétitifs comportant au moins trois molécules de rhamnose dont l'une est ramifiée, et deux autres sucres dont au moins l'un des deux est un acide uronique. Les nouveaux principes actifs selon l'invention sont caractérisés en ce que les éléments répétitifs, contenant majoritairement du rhamnose, comportent au moins les constituants suivants, et répondent à la formule générale I:



dans laquelle Rh est une molécule de rhamnose,  $\text{Rh}^*$  est une molécule de rhamnose liée à l'élément voisin d'une manière ramifiée, O est une molécule d'un sucre hexosidique ou pentosidique, U est une molécule d'acide uronique et n est compris entre 1 et 100, de préférence de 5 à 65.

La présente invention concerne également l'utilisation de composés comportant des séquences répétitives saccharidiques contenant au moins une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée et de préférence contenant majoritairement du rhamnose, comme agent cosmétique et/ou pharmaceutique, notamment dermatologique, stimulant la libération des  $\beta$ -endorphines.

La présente invention a également pour objet les compositions cosmétiques et/ou pharmaceutiques qui contiennent au moins un de ces nouveaux composés actifs, de formule I, éventuellement en association ou en mélange avec un ou plusieurs excipients ou véhicules

cosmétiques et/ou pharmaceutiques appropriés, pour l'application sur la peau, les muqueuses ou les phanères.

De telles compositions se rapportent notamment au soin et/ou au traitement de la peau, y compris des lèvres et des phanères(ongles, poils, cheveux..).

Les  $\beta$ -endorphines sont des neuropeptides issus du précurseur pro-opiomélanocortine(POMC) et ont déjà fait l'objet de nombreuses études publiées dans la littérature. On a notamment mis en évidence la présence de  $\beta$ -endorphines et de leur récepteur  $\mu$  au sein même de l'épiderme, et plus particulièrement au sein des kératinocytes (*Bigliardi P.L, et coll., 1998*). Ainsi, on a montré que les kératinocytes sont à la fois sensibles à de nombreux neuromédiateurs, notamment aux  $\beta$ -endorphines, synthétisés par des cellules nerveuses ou par d'autres cellules épidermiques, mais sont aussi capables de les synthétiser. Ce lien particulier existant entre les tissus nerveux et épidermiques pourrait s'expliquer par leur origine embryonnaire commune ectoblastique.

Les  $\beta$ -endorphines synthétisées par la peau représentent plus de 50% du taux d'endorphines circulantes et sont de ce fait particulièrement intéressantes pour atténuer ou supprimer les phénomènes douloureux.

La libération de  $\beta$ -endorphines peut être déclenchée en réponse à de nombreux signaux, notamment en réponse à un stress cellulaire, à la sécrétion d'autres médiateurs eux-mêmes induits par un stress (IL-1, IL-6,  $\text{TNF}\alpha$ , etc...) ou à la suite d'un effort physique important. Par ailleurs, d'autres mécanismes de libération cellulaire de  $\beta$ -endorphines existent en l'absence de stress cellulaire.

D'un point de vue physiologique, les  $\beta$ -endorphines sont des analgésiques chimiques naturellement produits par l'organisme qui, en interagissant avec les récepteurs opiacés, apportent à l'organisme une sensation de bien-être. Cette sensation s'accompagne d'un effet immunomodulateur. Des travaux récents ont mis en évidence les nombreuses interconnexions de l'épiderme et du derme avec les systèmes immunitaire et nerveux qui lui sont associés, respectivement par l'intermédiaire, notamment, des cellules de Langerhans et des terminaisons nerveuses.

Les  $\beta$ -endorphines sont également responsables de l'initiation d'un certain nombre de réactions biologiques qui se manifestent à tous les niveaux de l'organisme, par exemple, par la stimulation du système vasculaire et cardiaque, ou par une décontraction musculaire.

Ces neuromédiateurs constituent ainsi de véritables molécules "plaisir" car leur libération est accompagnée d'un effet apaisant ou de soulagement, au niveau local et général.

Ainsi, le développement de principes actifs susceptibles de stimuler, sans nécessiter de stress cellulaire, la libération de  $\beta$ -endorphines, est d'un grand intérêt.

On a déjà identifié, sans plus de précision, plusieurs extraits d'algues ou de plantes susceptibles d'induire la libération de  $\beta$ -endorphines. Ainsi, un extrait de cacao (*Theobroma cacao*), plus particulièrement sous la forme d'extrait hydroglycolique 30/70 titré en caféine et en théobromine et commercialisé sous la marque Caobromine<sup>®</sup> (CEP) est susceptible de déclencher une libération de  $\beta$ -endorphines. De même, on a décrit, dans le brevet FR-A1-2774292, un extrait d'une algue *Cyclotella* capable de déclencher une libération de  $\beta$ -endorphines, 16 fois supérieure à celle d'un témoin.

Selon la présente invention, la Demanderesse a découvert de manière inattendue que les polysaccharides et leurs dérivés, comportant des séquences répétitives saccharidiques contenant au moins une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée, ont la propriété de stimuler la libération cutanée des  $\beta$ -endorphines.

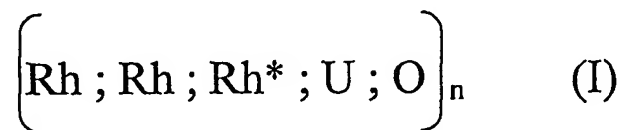
Les polysaccharides ainsi que leurs dérivés de faible poids moléculaire, d'origine végétale ou bactérienne, extraits d'algues ou produits par synthèse, présentent de nombreuses activités biologiques (immunomodulation, anti-inflammation, ...) et sont depuis de nombreuses années utilisés pour leurs propriétés potentielles dans de nombreux domaines d'application, par exemple en tant que gélifiant dans l'agroalimentaire, hydratant, démaquillant, texturant, etc... en cosmétique. Cependant, l'influence réelle de la composition et de la nature de ces principes actifs polysaccharidiques et/ou de leurs dérivés, sur lesdites propriétés biologiques, restait encore à déterminer.

On a déjà décrit, dans le document WO-A1-0203945, l'utilisation d'oligosaccharides de 2 à 6 sucres contenant au moins deux motifs galactose, notamment ceux extraits de la plante *Tephrosia* dans une composition cosmétique et/ou dermatologique pour stimuler la libération de  $\beta$ -endorphines par la peau.

Selon la présente invention, il a été identifié, de manière tout à fait inattendue, de nouveaux polysaccharides capables de stimuler, sans stress cellulaire, la sécrétion de  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes. Ces nouveaux agents cosmétiques et/ou dermatologiques sont, à la différence de l'art antérieur, constitués d'éléments répétitifs contenant au moins une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée, et de préférence contenant majoritairement du rhamnose ce qui, en outre, leur confèrent une haute affinité pour les kératinocytes.

Des études ont montré en effet que les kératinocytes humains présentent une affinité spécifique pour le rhamnose, supérieure à celle qu'ils peuvent avoir pour d'autres sucres comme le fucose, le galactose, la N-acetylglucosamine, en raison de la présence à la surface des membranes des kératinocytes, de récepteurs lectines spécifiques du rhamnose (Cerdan et al., *Bio. cell.* (1991) 73, 35-42). Dans le document brevet WO-A1-90/11069, on a en outre décrit l'utilisation du rhamnose dans une composition cosmétique et/ou dermatologique comme vecteur de fixation spécifique d'un composé actif sur la membrane d'un kératinocyte au moyen d'une liaison ligand-récepteur. Le rhamnose était par ailleurs également connu pour sa capacité à limiter les phénomènes biologiques aboutissant à l'allergie de type immunitaire (brevet FR-A1-2756735) ou utilisé, sous forme libre, obtenue après hydrolyse d'exopolysaccharides, comme agent de saveur ou comme arômes (brevet FR-A1-2624522). Cependant, aucune de ces études réalisées auparavant sur le rhamnose ne permettait de prévoir un tel effet stimulant du rhamnose sous la forme fixée de manière ramifiée à une chaîne saccharidique, sur la sécrétion cutanée d'endorphines.

Selon l'invention, les nouveaux principes actifs sont caractérisés en ce que les éléments répétitifs, contenant majoritairement du rhamnose, comportent au moins les composants de formule générale I :



dans laquelle Rh est une molécule de rhamnose, Rh\* est une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée, O est une molécule d'un sucre hexosidique ou pentosidique, U est une molécule d'acide uronique et n est compris entre 1 et 100, de préférence entre 5 et 65.

Par éléments répétitifs contenant majoritairement du rhamnose, on entend un enchaînement ramifié contenant, environ, au moins 50% de rhamnose de série D et/ou L, ainsi que ses isomères  $\alpha$  et/ou  $\beta$ .

Selon l'invention, on regroupe sous le terme « dérivés », les produits d'hydrolyse des polysaccharides et également les dérivés des sucres obtenus par modification chimique de la structure des saccharides selon l'invention. Pour que la molécule dérivée soit active sur la sécrétion de  $\beta$ -endorphines, il est toutefois nécessaire que la ramification rhamnose et/ou la molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée sur l'enchaînement saccharidique ne soient pas globalement altérées par les réactions chimiques afin que le rhamnose ramifié reste accessible. Pour que la molécule dérivée soit active, la molécule de rhamnose initialement en position ramifiée, peut tout à fait, suite à une modification chimique, se situer en position terminale de la molécule dérivée.

Ainsi, selon l'invention, les nouveaux dérivés sont définis comme tout composé de nature saccharidique pour autant qu'il contienne au moins une molécule de rhamnose accessible située en bout de chaîne ou ramifiée et soit constitué majoritairement de rhamnose. Les nouveaux dérivés selon l'invention ont alors la même structure que le nouveau polysaccharide selon l'invention et/ou en sont issus, ce qui conduit à des composés pour lesquels n a une valeur plus faible. Il peut donc particulièrement s'agir de produits d'hydrolyse oligosaccharidiques. Ces hydrolysats ou fractions peuvent notamment être obtenus à partir d'un polysaccharide de poids moléculaire plus élevé, par des techniques de dégradation connues, notamment par hydrolyse enzymatique ou hydrolyse chimique.

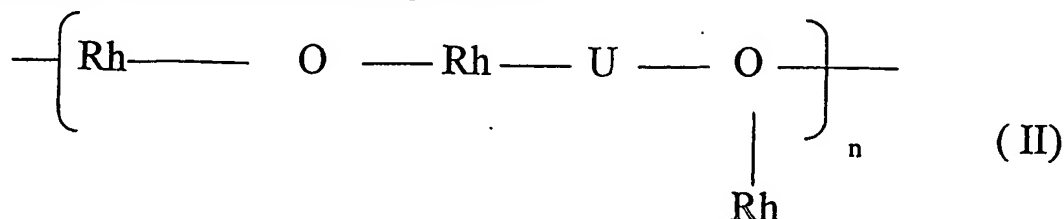
Les dérivés de sucres obtenus par modification chimique peuvent être des dérivés aminés, acides, et des sels de saccharides et/ou des produits d'hydrolyse prédéfinis.

Le sucre O peut notamment être choisi parmi le fucose, le galactose, le ribose, l'arabinose, le xylose et le mannose.

Par acide uronique U, on entend tout hexose oxydé sur sa fonction alcool primaire en acide carboxylique, notamment l'acide glucuronique, acide galacturonique, acide mannuronique ou l'acide iduronique.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la molécule de rhamnose ramifiée peut être fixée par une liaison osidique depuis son carbone 1 sur un carbone libre d'une des molécules de sucre O ou d'acide uronique U ou de rhamnose Rh de la chaîne saccharidique, notamment sur les carbones 2 ou 3.

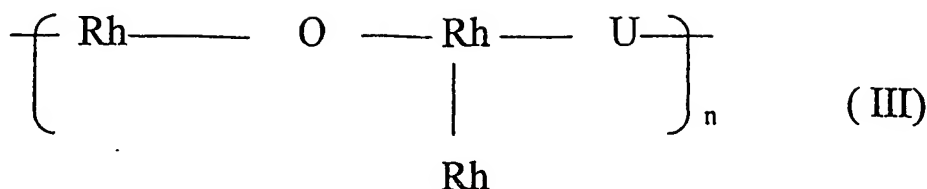
Selon un autre mode particulier de réalisation, les éléments répétitifs peuvent notamment être constitués par la séquence de formule générale II:



dans laquelle Rh est une molécule de rhamnose, O est une molécule d'un sucre hexosidique ou pentosidique, U est une molécule d'acide uronique et la ramification du rhamnose sur l'ose O se fait selon une liaison osidique (1→2) ou (1→3).

Selon un mode de réalisation particulièrement intéressant, le sucre O est le galactose et l'acide uronique U est l'acide glucuronique. De préférence, la séquence présente un enchaînement contenant 3 molécules de rhamnose dont une est ramifiée, 2 molécules de galactose et une molécule d'acide glucuronique. Un polysaccharide particulièrement intéressant selon l'invention a été identifié et est présenté dans l'exemple 1. Selon la formule II, n représente une valeur telle que ce polysaccharide a un poids moléculaire de l'ordre de 50 000 daltons. Il peut être obtenu à partir de cultures de bactérie de type *Klebsiella* notamment *Klebsiella pneumoniae* et notamment la souche I-714 (N<sup>o</sup>CNCM I-2743-Collection Nationale de Culture de Microorganismes) selon un procédé décrit ci-après. Avantageusement, ce polysaccharide présente la ramification rhamnose sur le galactose en position V. Il ressort des analyses présentées à l'exemple 1 que ce polysaccharide est plus particulièrement constitué de l'unité répétitive suivante : →4)- α-L-Rhap(1→3)- β-D-Galp(1→2)- α-L-Rhap(1→4)- β-D-GlcpA(1→3)- [α-L-Rhap(1→2)]- α-D-Galp(1→. L'hydrolyse de ce polysaccharide permet en outre d'obtenir un mélange de fractions de poids moléculaire plus faible, notamment les fractions majoritaires de 5 000 daltons et de 13 000 daltons, éventuellement purifiables et particulièrement intéressantes selon l'invention.

Selon un autre mode particulier de réalisation, les éléments répétitifs peuvent notamment être constitués par la séquence de formule générale III:



dans laquelle Rh est une molécule de rhamnose, O est une molécule d'un sucre hexosidique ou pentosidique, U est une molécule d'acide uronique et la ramification du rhamnose sur le rhamnose se fait selon une liaison osidique (1→3). Selon un mode de réalisation particulièrement intéressant, le sucre O est le glucose et l'acide uronique U est l'acide glucuronique, de préférence selon un enchaînement contenant 3 molécules de rhamnose dont une ramifiée, une molécule de glucose et une molécule d'acide glucuronique. Un tel polysaccharide peut notamment être obtenu selon le procédé décrit ci-après à partir d'une culture de bactérie du type *Klebsiella planticola* notamment la souche I-2743 (N<sup>o</sup>CNCM I-2743-Collection Nationale de Culture de Microorganismes). Avantagusement, ce polysaccharide, tel que décrit dans l'exemple 2 et dénommé BEC291, présente la ramification rhamnose sur le rhamnose en position III. Il ressort des analyses présentées à l'exemple 2 que ce polysaccharide est plus particulièrement constitué de l'unité répétitive suivante : →3)- β-L-Rhap(1→4)- β-D-Glcp(1→2)- [α-L-Rhap(1→3)]- α-L-Rhap (1→4)- α-D-GlcpA(1→.

L'hydrolyse de ce polysaccharide permet en outre d'obtenir un mélange de fractions de poids moléculaire plus faible, notamment la fraction majoritaire de 5 000 daltons, éventuellement purifiable et particulièrement intéressante selon l'invention.

D'une manière générale, les polysaccharides ou les dérivés saccharidiques peuvent être d'origine bactérienne ou végétale, ... Ils peuvent être obtenus par les techniques classiques de production des polysaccharides (synthèse chimique, extraction enzymatique d'exopolysaccharides..). Selon une réalisation avantageuse, les polysaccharides sont des exopolysaccharides obtenus par fermentation d'une souche bactérienne en produisant, de type bactéries encapsulées, selon un procédé de production tel que celui détaillé dans le brevet FR-B1-264522. Ce procédé se définit en ce qu'une souche de bactéries de type *Klebsiella* est mise en culture dans un milieu nutritif comprenant une source de carbone, une source d'azote préférentielle et des sels minéraux appropriés, à un pH d'environ 6 à 8, à une température d'environ 30 à 35 °C, sous agitation et sous aération, pendant 4 à 12 jours. Le rapport carbone/azote est avantagusement supérieur à 5 afin de favoriser la sécrétion du polysaccharide. Le polysaccharide peut ensuite être isolé en soumettant le milieu de

fermentation à un traitement thermique à 70-120°C environ, pendant 10 minutes à 1 heure environ, puis en le séparant, par exemple en le centrifugeant à froid. Les exopolysaccharides et les polysaccharides cellulaires se retrouvent intégralement dans la phase surnageante claire. Si nécessaire, les polysaccharides peuvent être purifiés par précipitation par addition d'un liquide organique non-solvant tel que l'acétone ou un alcool inférieur tel que l'éthanol ou le propanol, et séparés par filtration ou centrifugation avant d'être séchés.

Les polysaccharides isolés peuvent ainsi aisément être incorporés dans une composition, tels quels ou sous forme hydrolysée. Dans ce cas, l'hydrolyse peut être réalisée avant séchage par des méthodes connues telles que l'hydrolyse acide. Elle peut être effectuée en utilisant un donneur de protons habituellement utilisé, tel que l'acide chlorhydrique, à une température allant de 50 à 100°C et pendant 30 minutes à 4 heures, selon la taille souhaitée des fractions. Les fractions oligosaccharidiques ainsi obtenues peuvent être récupérées et purifiées si besoin selon les méthodes classiques.

Ce protocole peut être réalisé à partir de souches bactériennes produisant des exopolysaccharides riches en rhamnose, en particulier les bactéries encapsulées. Selon une réalisation préférée de l'invention, on utilise une souche de bactéries *Klebsiella*, de préférence *Klebsiella pneumoniae* ou *Klebsiella planticola*.

Selon l'invention, on peut utiliser le polysaccharide seul ou un mélange de polysaccharides hétérogènes et/ou un mélange de leurs dérivés.

Les polysaccharides seuls et/ou le mélange de polysaccharides et/ou de leurs dérivés peuvent également, dans le cadre de l'invention, être utilisés en tant que principe actif sous forme greffée, notamment par des moyens chimiques de substitution sur la fonction carboxylique libre de l'acide uronique U, sur un reste chimique, biochimique ou biologique qui ne modifie pas l'effet stimulant de la sécrétion des  $\beta$ -endorphines. A titre d'exemple, il peut s'agir de chaînes grasses comportant de 6 à 30 atomes de carbone ou de chaînes d'acides aminés. On peut également incorporer des polysaccharides et/ou leurs dérivés selon l'invention dans une cyclodextrine.

En outre, il a été découvert que les polysaccharides et/ou leurs dérivés selon l'invention possèdent d'autres propriétés remarquables, notamment d'inhibition de l'adhésion cellulaire des neutrophiles aux kératinocytes (40% d'inhibition à 2% du composé décrit dans l'exemple 1) et présentent une très bonne affinité pour les kératinocytes, au moins égale à celle du

rhamnose (60% d'inhibition de la fixation des néoglycoprotéines obtenue avec 8% du composé décrit dans l'exemple 1). Ces deux propriétés ont notamment été démontrées dans les exemples 4 et 5.

Les polysaccharides et/ou leurs dérivés précédemment définis conviennent donc particulièrement pour une utilisation comme agent cosmétique et/ou pharmaceutique et plus particulièrement dermatologique, notamment pour stimuler la libération cutanée de  $\beta$ -endorphines.

L'invention a donc également pour objet les compositions cosmétiques et/ou pharmaceutiques et en particulier dermatologiques comprenant, à titre de principe actif, au moins un composé polysaccharidique et/ou un dérivé tel que précédemment défini, éventuellement en association ou en mélange avec un ou plusieurs excipients ou véhicules cosmétiques et/ou pharmaceutiques appropriés. Lesdits polysaccharides et/ou dérivés peuvent être incorporés dans ces compositions à une concentration variant entre 0.001% et 20% en poids, et de préférence entre 0.01% et 10% en poids total de la composition.

Selon une réalisation particulièrement avantageuse, la composition contient, à titre de principe actif, le polysaccharide Rhamnosoft® de l'exemple 1 et/ou le polysaccharide BEC291 de l'exemple 2.

Les compositions selon l'invention peuvent se présenter sous toute forme appropriée pour l'application cutanée, notamment sous la forme d'un gel, d'une émulsion, par exemple, une émulsion huile-dans-eau ou eau-dans-huile, ou sous la forme d'une émulsion multiple, à cristaux liquides ou non. Elles peuvent également être sous la forme de solution aqueuse, de lotion, de lait, de crème, de masque, de mousse. Il est également possible de les utiliser sous la forme de patches.

Selon l'invention, la composition peut en outre comporter les excipients habituels pharmaceutiques et/ou cosmétiques acceptables appropriés. Parmi ces excipients, on peut notamment citer des agents de protection solaire notamment pour la réalisation de soins solaires, des agents gélifiants hydrophiles ou lipophiles, des actifs hydrophiles ou lipophiles, des gommes, des résines, des agents tensioactifs, des solvants, des charges telles que l'amidon de riz, des pigments, des agents conservateurs, des huiles essentielles, des agents antioxydants, des colorants, des pigments, des nacrés, des paillettes, des parfums, des

absorbants d'odeur, des agents régulateurs de pH ou des agents neutralisants, des agents pénétrants, des agents épaississants, tels que ceux habituellement utilisés.

Le choix et/ou la quantité des ingrédients complémentaires à la composition seront naturellement déterminés par le choix des propriétés physiques et de la consistance souhaitée pour la composition conforme à l'invention. On emploie les différents adjuvants dans des proportions classiquement utilisées dans le domaine de la cosmétique, à savoir par exemple de 0.01 à 20 % du poids total de la composition, le complément étant constitué par un véhicule tel que l'eau ou un mélange eau-alcool.

Tout autre produit influençant positivement la libération de  $\beta$ -endorphines peut également être incorporé dans la composition selon l'invention, notamment l'extrait de cacao commercialisé sous le nom Caobromine<sup>®</sup> (CEP).

En outre, la composition peut encore contenir un deuxième principe actif compatible, notamment pour un usage dermatologique, afin de conférer une double propriété à la composition ou afin de limiter les sensations inconfortables liées à l'application de ce deuxième principe actif. A titre d'exemples de principes actifs, on peut notamment citer les antiseptiques locaux tels que le peroxyde de benzoyle, les anti-acnéiques locaux tels que la trétinoïne, un antibiotique local tels que le sulfacétamide pour réduire les effets secondaires d'irritation locale, un anti-inflammatoire local tel que l'ibuprofène. Le deuxième principe actif est ajouté à la composition en une quantité thérapeutique habituellement efficace.

La composition selon l'invention peut être réalisée de manière conventionnelle, selon les procédés connus habituellement utilisés dans le domaine de la cosmétologie et/ou de la dermatologie.

Dans le domaine cosmétique, les compositions peuvent être utilisées pour le soin quotidien et/ou le traitement et/ou la protection de la peau du corps et/ou du visage et/ou des phanères (ongles, poils, cheveux...). En stimulant la production de  $\beta$ -endorphines, ces compositions présentent des propriétés apaisantes, calmantes, notamment de l'inconfort cutané pouvant résulter par exemple d'irritations, d'agressions de la peau, en particulier par des agents extérieurs tels que certains traitements thérapeutiques, les agents climatiques (le vent, le froid, les coups de soleil, ..), les épilations, les rasages, les piqûres d'insectes...et procurent ainsi une sensation de bien-être. Elles peuvent donc particulièrement être utilisées pour le soin des peaux sensibles ou sensibilisées.

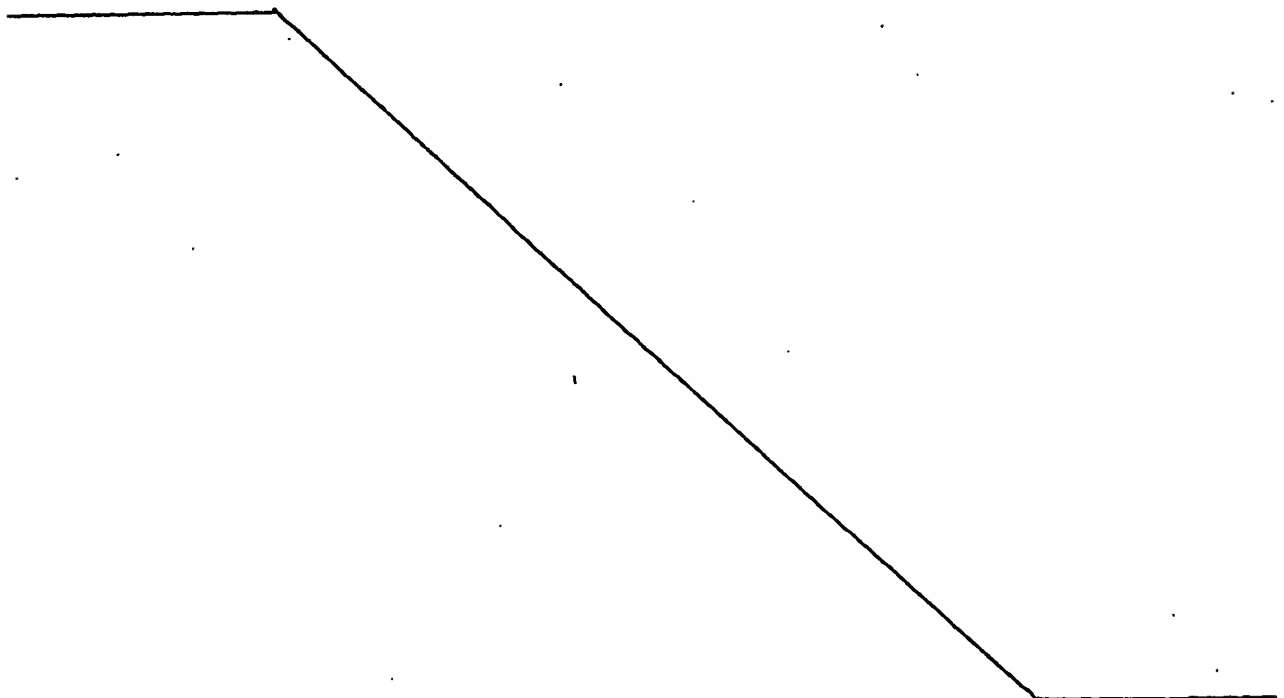
De telles compositions procurent également un effet analgésique local et peuvent en outre être utilisées dans le domaine pharmaceutique et plus particulièrement dermatologique pour soulager les douleurs cutanées et/ou sous-cutanées, pour supprimer la perception désagréable des réactions cutanées, les sensations d'inconfort de la peau qui se manifestent notamment dans les cas d'allergies, de prurit, de démangeaisons, de piqûres d'insectes.

L'invention a donc également pour objet l'utilisation des agents polysaccharidiques selon l'invention pour la réalisation d'un médicament destiné à soulager des douleurs cutanées et/ou sous cutanées, et/ou à supprimer les sensations d'inconfort de la peau (allergies, prurit, irritations, douleurs cutanées liées à des brûlures, piqûres, gerçures, coupures ...) par application locale.

Selon un autre aspect, l'invention concerne également un procédé de soin cosmétique comprenant l'application sur une zone de la peau et/ou des phanères concernée d'au moins un composé actif précédemment défini dans un excipient cosmétiquement acceptable ou éventuellement sous la forme d'une des compositions cosmétiques précédemment définies.

Les compositions selon l'invention ne présentent aucune toxicité et n'entraînent aucune intolérance locale. Elles ne sont pas non plus allergisantes.

Les exemples et les préparations suivants illustrent l'invention sans la limiter aucunement. Dans les exemples et les préparations, les proportions indiquées sont des pourcentages en volume/volume.



**Exemple 1 : Exemple de structure de l'unité répétitive de l'exopolysaccharide produit par *Klebsiella pneumoniae* I-714 et dénommé Rhamnosoft® :**

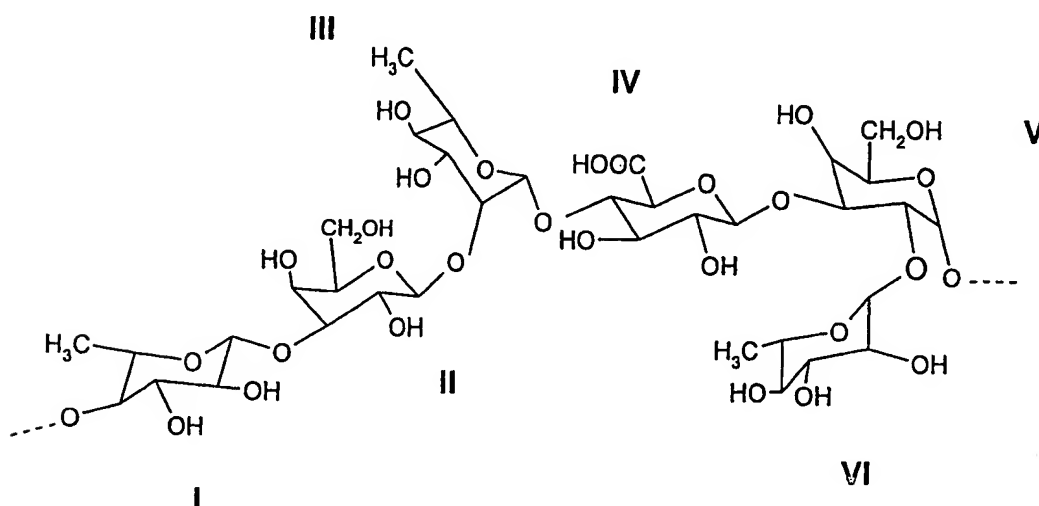
La composition de Rhamnosoft® a été étudiée par la procédure d'analyse par chromatographie en phase gazeuse GC et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) des produits de dégradation après perméthylation de la molécule native. La méthode de dégradation des acides uroniques par  $\beta$ -élimination après perméthylation (décrite par Aspinall GO et al. *Carbohydr Res.* 1977 May;55:11-9) a été utilisée notamment pour confirmer la position et la nature des substituants du résidu de galactose II. La séquence Rhamnosoft a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN).

De structure ramifiée, ce polymère de poids moléculaire de l'ordre de 50 000 daltons présente donc une séquence saccharidique comportant trois molécules de rhamnose (I, III, VI), deux molécules de galactose (II, V), une molécule d'acide glucuronique (IV). Le rhamnose constitue donc 50% du polysaccharide. Le polysaccharide présente une ramification rhamnose VI sur le galactose en position V.

La structure de l'unité de répétition est dans ce cas :

$\rightarrow 4)$ -  $\alpha$ -L-Rhap(1 $\rightarrow$ 3)-  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 2)-  $\alpha$ -L-Rhap(1 $\rightarrow$ 4)-  $\beta$ -D-GlcpA(1 $\rightarrow$ 3)- [ $\alpha$ -L-Rhap(1 $\rightarrow$ 2)]-  $\alpha$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ ).

Elle répond à la formule détaillée ci-après :



Dans les tests suivants (exemples 3 à 7), le produit selon l'invention est utilisé en solution aqueuse de 2.5%(p/p) en matière sèche.

**Exemple 2 : Exemple de structure de l'unité répétitive de l'exopolysaccharide produit par *Klebsiella planticola* I-2743 et dénommé BEC 291 :**

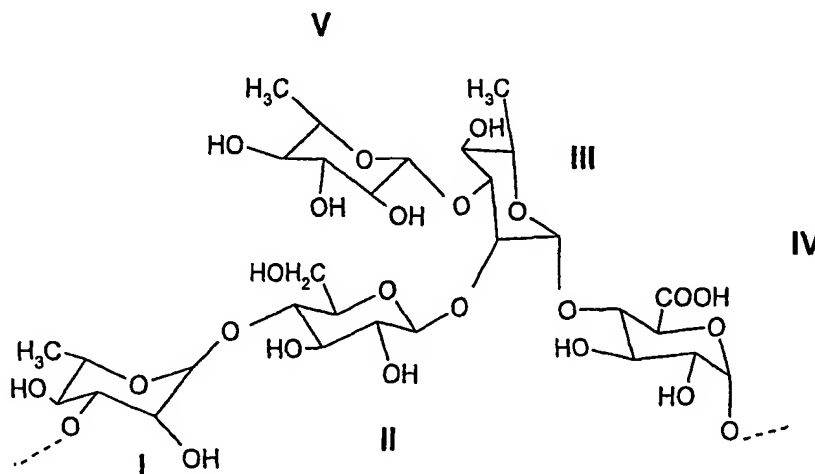
La composition de BEC 291 a été étudiée par la procédure d'analyse par chromatographie en phase gazeuse GC et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) des produits de dégradation après perméthylation de la molécule native. La méthode de dégradation des acides uroniques par  $\beta$ -élimination après perméthylation (décrite par Aspinall GO et al. *Carbohydr Res.* 1977 May;55:11-9) a été utilisée. La séquence BEC 291 a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN).

De structure ramifiée, ce polymère présente donc une séquence saccharidique comportant trois molécules de rhamnose (I, III, V), une molécule de glucose (II), une molécule d'acide glucuronique (IV). Ce polysaccharide présente donc bien une ramification rhamnose V sur le rhamnose en position III.

La structure de l'unité de répétition dans ce cas est :

$\rightarrow 3)- \beta\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 4)- \beta\text{-D-Glcp}(1\rightarrow 2)- [\alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 3)]- \alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 4)- \alpha\text{-D-GlcpA}(1\rightarrow$

Elle répond à la formule détaillée ci-après :



**Exemple 3 : Etude de l'effet des polysaccharides selon l'invention contenant 50% de rhamnose sur la libération de  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes.**

▫ **Mode opératoire :** Des kératinocytes humains normaux sont mis en culture pendant 48 heures. Ils sont traités pendant 36 heures avec le produit à tester. Les surnageants, contenant la  $\beta$ -endorphine, sont recueillis et conservés à -20°C jusqu'au dosage. Le témoin du test est réalisé en traitant les kératinocytes avec l'excipient (butylène glycol 70%) à 2%. Le dosage est effectué avec un kit ELISA (dosage spectrophotométrique à 450 nm).

Les résultats sont exprimés en picogrammes par millilitre de  $\beta$ -endorphine synthétisée.

Des études préalables de cytotoxicité ont été systématiquement effectuées dans ces exemples afin de montrer que les effets du produit ne sont pas liés à un effet cytotoxique. Un témoin positif de libération de  $\beta$ -endorphines a été réalisé en utilisant du PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) qui, en tant qu'agent agressant des kératinocytes, induit la libération de  $\beta$ -endorphines par un mécanisme de stress cellulaire.

**a) Effet de Rhamnosoft®**

Rhamnosoft® est testé aux concentrations de 1% et 5%.

Essais	Témoin	Rhamnosoft® 1%	Rhamnosoft® 5%
Moyenne	106	155 (*)	160 (*)
Ecart type	27	28	46
% témoin	-	46	51

*Effet de Rhamnosoft® sur la production de  $\beta$ -endorphines*

*((\* : validation : moyenne significativement différente par rapport au témoin ( $p < 0,05$ ))*

Il ressort de ces résultats que Rhamnosoft®, aux concentrations de 1 et 5% provoque une sécrétion accrue de  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes. Les études préalables ont démontré l'absence de cytotoxicité de ce type de produit vis à vis des kératinocytes humains, et ce, quelles que soient les concentrations de Rhamnosoft® testées.

On peut considérer que l'effet de Rhamnosoft® sur les kératinocytes se produit donc par un mécanisme différent de celui précédemment décrit et indépendant du stress cellulaire.

**b) Effet de fractions hydrolysées de Rhamnosoft® de 13 kdaltons et 5 kdaltons.**

Les fractions hydrolysées de Rhamnosoft® de 13 kdaltons et de 5 kdaltons sont majoritairement obtenues lors de l'hydrolyse acide de Rhamnosoft® réalisée en présence d'acide chlorhydrique à une concentration de l'ordre de 0.1 à 2.5 mole/litre, à une température

de 50 à 100°C pendant respectivement 30 minutes et 4 heures. Elles peuvent être purifiées si nécessaire par précipitation éthanolique ou par des méthodes physiques.

Essais	Témoin	Fraction 13 kd			Fraction 5 kd	
%	-	0,01%	0,05%	0,1%	0.01%	0.05%
Moyenne	91	213 (*)	182(*)	NS	233 (*)	204 (*)
Ecart type	25	83	79	-	76	34
% de stimulation par rapport au témoin	-	134	100	-	153	124

*Effet de fractions hydrolysées de Rhamnosoft®, respectivement de 13 kd et 5 kd, sur la production de  $\beta$ -endorphines*  
 ((\* : validation : moyenne significativement différente par rapport au témoin ( $p < 0,05$ )))

Il ressort nettement des résultats que les fractions 13 kd et 5 kd, produits d'hydrolyse de Rhamnosoft®, aux concentrations de 0.01 et 0.05% provoquent une augmentation importante de la libération de  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes. Les études préalables ont montré l'absence de cytotoxicité et confirment donc que l'effet des fractions hydrolysées de Rhamnosoft® n'est pas dû à un stress cellulaire mais bien à une interaction des fractions saccharidiques avec les récepteurs des kératinocytes

**c) Effet d'un polysaccharide de type BEC 291.**

BEC 291 a été testé au concentrations de 0.001% et 0.02%

Essais	Témoin	BEC 291/ 0,001%	BEC 291/ 0,02%
Moyenne	114	180 (*)	208 (*)
Ecart type	37	34	23
% de stimulation par rapport au témoin	-	58	82

*Tab. 3 : Effet du polysaccharide BEC 291 sur la production de  $\beta$ -endorphines*  
 ((\* : validation : moyenne significativement différente par rapport au témoin ( $p < 0,05$ )))

Il apparaît que le polysaccharide BEC291 présente également la capacité de stimuler la libération de  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes humains. Les études préalables ont démontré l'absence de cytotoxicité vis à vis des kératinocytes et ce, quelles que soient les concentrations de BEC 291. Là encore, l'effet du polysaccharide BEC 291 sur la sécrétion de  $\beta$ -endorphines n'est pas dû à un stress cellulaire mais bien à une interaction entre les fractions saccharidiques et les récepteurs des kératinocytes.

**d) Effet de FrBEC 291, fraction hydrolysée de BEC 291 de 5 kd.**

Cette fraction FrBEC291 est majoritairement obtenue par hydrolyse acide de BEC 291, réalisée en présence d'acide chlorhydrique à une concentration de l'ordre de 0.1 à 2.5 mole/litre, à une température de 50°C à 100°C pendant 4 heure.

Essais	Témoin	Fr BEC 291 0,001%	Fr BEC 291 0,01%	FrBEC 291 0.02%
Moyenne	115	283	203 (*)	242
Ecart type	60	150	57	41
% de stimulation par rapport au témoin	-	146	76	110

Tab. 3 : Effet du polysaccharide BEC 291 sur la production de  $\beta$ -endorphines  
 ((\* : validation : moyenne significativement différente par rapport au témoin ( $p < 0,05$ )))

Il apparaît que la fraction oligosaccharidique de BEC291, à toutes les concentrations testées, induit une forte stimulation de la libération de  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes humains. Les études préalables ont également montré que cette fraction est dénuée d'effet cytotoxique. Son effet ne peut donc s'expliquer que par un mécanisme indépendant du stress cellulaire, véritablement lié à une interaction entre les fractions saccharidiques et les récepteurs des kératinocytes.

Par ailleurs, ces tests montrent que les polysaccharides et/ou leurs dérivés selon l'invention, contenant un rhamnose ramifié et suffisamment « riches » en rhamnose, et plus particulièrement contenant majoritairement du rhamnose, stimulent la libération de  $\beta$ -endorphines par les kératinocytes. Tous ces produits dénués de cytotoxicité vis à vis des kératinocytes agissent par un mécanisme d'action qui n'est pas lié au stress cellulaire.

#### **Exemple 4 : Etude de l'affinité des kératinocytes vis à vis de polysaccharides selon l'invention contenant 50% de rhamnose.**

**Mode opératoire:** *Expérience 1 :* La spécificité de reconnaissance osidique des récepteurs membranaires des kératinocytes a été déterminée en utilisant des néoglycoprotéines fluorescentes (NGP). Pour ce faire, les kératinocytes humains ont été incubés avec différents types de néoglycoprotéines. L'Albumine de Sérum Bovine (BSA) a été utilisée comme protéine support. La fixation des NGP a été déterminée en mesurant l'indice de fluorescence.

*Expérience 2 :* L'expérience 1 a été renouvelée en présence de Rhamnosoft® afin de déterminer son effet inhibiteur sur la fixation des NGP fluorescentes sur les kératinocytes humains. Pour ce faire, les kératinocytes humains ont été pré-incubés pendant 15 min avec différentes concentrations de Rhamnosoft®. A l'issue de cette période, les NGP fluorescentes ont été ajoutées à la concentration de 100  $\mu$ g/ml et l'expérience 1 a été renouvelée.

*Expérience 3 :* La fixation spécifique de Rhamnosoft® sur les kératinocytes humains a été étudiée par la technique de marquage de Rhamnosoft® par un dérivé fluorescent et par la technique de fixation de billes de latex fluorescentes imprégnées de Rhamnosoft®. Rhamnosoft® a tout d'abord été marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FTC). Les kératinocytes humains ont été incubés en présence de Rhamnosoft® ainsi polymérisé, à différentes concentrations s'échelonnant notamment de 0.025% à 0.4%. La fixation a été déterminée en mesurant l'indice de fluorescence et la fixation obtenue pour une concentration de 0.4% de Rhamnosoft®-FTC a été visualisée en microscopie à fluorescence Biorad MRC1025 à 488nm et 520nm et en contraste de phase. La technique utilisant des billes de latex a été réalisée en utilisant des billes de latex Polysciences de 0.2 µm de diamètre sous forme -COOH activées. Les kératinocytes ont été incubés pendant 30 min à 37°C en présence de billes sur lesquelles le Rhamnosoft® a été immobilisé. Les cellules sont ensuite lavées et fixées par le paraformaldéhyde (1% w/v dans le PBS) pendant 30 minutes à 20°C. Les résultats ont été visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence Biorad MRC1025 à 488nm et 520nm et en contraste de phase.

*Remarque :* Dans toutes ces expériences, toutes les incubations avec des kératinocytes humains ont été effectuées pendant 20 minutes à 37°C, sauf mention contraire. Tous les tests ont été effectués en triplicate pour plusieurs concentrations du produit testé. L'indice de fluorescence indiquant la fixation a toujours été évalué par cytométrie de flux (FACS 440 Becton Dickinson).

### **Résultats :**

-L'expérience 1 a confirmé que les kératinocytes humains ont une affinité préférentielle pour le rhamnose. En effet, à des concentrations comprises entre 10 µg/ml et 200 µg/ml, l'indice de fluorescence de la néoglycoprotéine contenant du rhamnose est environ deux fois plus élevé que celui des autres néoglycoprotéines contenant notamment du fucose, du glucose, ou de la Nacétylglucosamine. Un phénomène de saturation des récepteurs est en outre apparu à partir de 200µg/ml pour le rhamnose.

-L'expérience 2 a permis de mettre en évidence l'affinité très élevée de Rhamnosoft® pour les kératinocytes. En effet, la fixation de tous les NGP a été inhibée d'environ 10% à partir d'une concentration de 3%v/v de Rhamnosoft®. En outre, cette action a été particulièrement importante sur les NGP à rhamnose puisque 10% à 60% d'inhibition environ a été observée pour des concentrations respectives de 0.5% à 8%v/v de Rhamnosoft®.

-L'expérience 3 a permis de vérifier que les résultats obtenus lors des expériences précédentes n'étaient pas dus à une interaction directe entre le Rhamnosoft® et les NGP. Les résultats sont les suivants :

Concentration de Rhamnosoft® fluorescent en %	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4
Indice de fluorescence	10	27	52	123	183

De même, Rhamnosoft® a été nettement mis en évidence au niveau des membranes des kératinocytes, par fluorescence et par contraste de phase.

**Bilan :** Il apparaît ainsi clairement que le polysaccharide selon l'invention se fixe spécifiquement sur les récepteurs membranaires des kératinocytes humains avec une affinité particulièrement élevée.

**Exemple 5 : Etude de l'effet des polysaccharides selon l'invention contenant 50% de rhamnose sur l'adhésion des neutrophiles aux kératinocytes**

**Mode opératoire :** Les kératinocytes ont été pré-incubés pendant 24 heures en présence de Rhamnosoft® à différentes concentrations et en présence de 3µg/ml de lipopolysaccharides(LPS). Des neutrophiles humains préalablement rendus fluorescents par traitement à la calcéïne sont ensuite ajoutés. Après 2 heures de contact, les kératinocytes sont lavés et lysés. L'inhibition de l'adhésion des neutrophiles est déterminée par la mesure de l'indice de fluorescence.

**Résultats :**

Le LPS est un agent inducteur de l'inflammation.

Concentration de Rhamnosoft® fluorescent en %	1	2
Pourcentage d'inhibition de l'adhésion des neutrophiles	22	40

Il apparaît donc que le polysaccharide selon l'invention induit une inhibition de l'adhésion cellulaire des neutrophiles aux kératinocytes.

**Exemple 6 : Exemples de formulations cosmétiques selon l'invention.**

Ces préparations ont été obtenues par simple mélange des ingrédients.

***Gelée hydratante peaux sensibles*****Phase A :**

Eau déminéralisée	qsp 100%
Dihydrogenoéthylènediamine tetraacétate disodique	0,2%
Urée	3,00%
Glycérol	1,50%
Carbomer	1,00%
Rhamnosoft®	3,00%
conservateurs	qsp
triéthanolamine	eqs

**Phase B :**

Mélange de PCA* de Sodium, de Magnésium, de Zinc et de Manganèse	1,00%
Polysorbate 20	3,00%
Parfum	0,15%

***Lait solaire*****Phase A :**

PEG-30 Dipolyhydroxystearate	2,00%
Isohexadecane	8,00%
Octylmethoxycinnamate	5,00%
Huile de monoï	4,00%
Butyl Methoxydibenzoylmethane	1,50%
conservateurs	qsp

**Phase B :**

Eau déminéralisée	qsp 100%
Disodium Dihydrogenoethylenediamine tetraacetate	0,2%
Glycérol	1,50%
Sulfate de magnésium heptahydrate	0,70%
Rhamnosoft®	3,00%
conservateurs	qsp

**Phase C :**

Eau déminéralisée	15,00%
Acide Phenylbenzimidazole Sulfonique	1,50%
Soude	qs pH

**Phase D :**

Fucogel 1000 / Polysaccharide riche en fucose	4,00%
---	-------

**Phase E :**

Silica Dimethyl Silylate	0,30%
--------------------------	-------

\* : PCA=acide pyrrolidone-carboxylique

**Exemple 7 : Exemples de formulations dermatologiques selon l'invention.**

Ces préparations ont été obtenues par simple mélange des ingrédients.

***Pommade bien-être anti-moustique :***

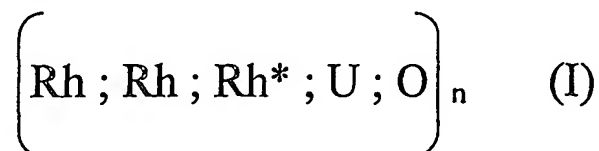
Rhamnosoft	4%
repellent 3535 (ethylbutylacetylaminopropionate)	15%
filtre solaire UV B	2%
essence de lavande	0.4%
enoxolone	0.5%
excipient	qsp 100

***Crème apaisante antibiotique cutanée pour peaux lésées ,infectées, panaris***

p-aminophényl sulfamide	2%
Rhamnosoft	3%
Butylhydroxyanisole	0.05%
Alcool cétylique	1%
Glycérol	0.75%
Paraffine liquide	2%
Sorbate de potassium	0.02%
Polysorbate 60	0.5%
Vaseline	0.4%
Eau purifiée	qsp 100

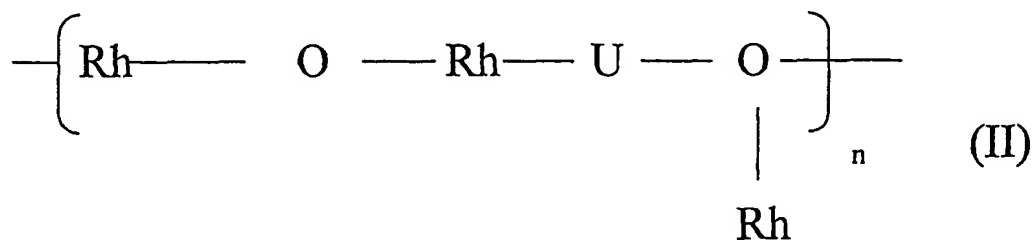
REVENDICATIONS

1. Nouveaux polysaccharides stimulant la libération de  $\beta$ -endorphines, caractérisés en ce qu'ils sont constitués d'éléments répétitifs qui contiennent majoritairement du rhamnose et comportent au moins les composants suivants de formule générale I :



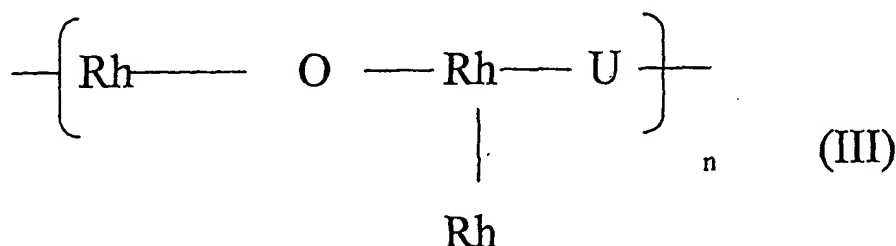
dans laquelle Rh est une molécule de rhamnose,  $\text{Rh}^*$  est une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée, O est une molécule d'un sucre hexosidique ou pentosidique, U est une molécule d'acide uronique et n est compris entre 1 et 100, et de préférence entre 5 et 65.

2. Polysaccharides selon la revendication 1, caractérisés en ce que la ramification du rhamnose  $\text{Rh}^*$  se fait selon une liaison osidique (1 $\rightarrow$ 2) ou (1 $\rightarrow$ 3) sur la chaîne saccharidique.
3. Polysaccharides selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que le sucre O est choisi parmi le fucose, le galactose, le glucose, le ribose, l'arabinose, le xylose et le mannose.
4. Polysaccharides selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que les éléments répétitifs sont constitués par la séquence suivante de formule II:



dans laquelle Rh est une molécule de rhamnose, O est une molécule d'un sucre hexosidique ou pentosidique, U est une molécule d'acide uronique et la ramification du rhamnose sur l'ose O se fait selon une liaison osidique (1 $\rightarrow$ 2) ou (1 $\rightarrow$ 3).

5. Polysaccharides selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que l'élément répétitif est composé d'un enchaînement constitué de 3 molécules de rhamnose dont une ramifiée, de 2 molécules de galactose et d'une molécule d'acide glucuronique.
6. Polysaccharide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les éléments répétitifs ont la séquence suivante :  $\rightarrow 4)- \alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 3)- \beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow 2)- \alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 4)- \beta\text{-D-GlcpA}(1\rightarrow 3)- [\alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 2)]- \alpha\text{-D-Galp}(1\rightarrow .$ , n représentant une valeur telle que le poids moléculaire soit d'environ 50 000 daltons.
7. Polysaccharides selon la revendication 6, caractérisés en ce que lesdits polysaccharides sont sous forme d'hydrolysat de fractions de 5 000 et/ou 13 000 daltons, purifiées ou en mélange.
8. Polysaccharides selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que les éléments répétitifs sont constitués par la séquence suivante de formule III:



dans laquelle Rh est une molécule de rhamnose, O est une molécule d'un sucre hexosidique ou pentosidique, U est une molécule d'acide uronique et la ramification du rhamnose sur le rhamnose se fait selon une liaison osidique (1→3).

9. Polysaccharides selon la revendication 8 ou selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que l'élément répétitif est composé d'un enchaînement constitué de 3 molécules de rhamnose dont une ramifiée, d'une molécule de glucose et d'une molécule d'acide glucuronique.
10. Polysaccharide selon la revendication 9, caractérisé en ce que les éléments répétitifs ont la séquence suivante :  $\rightarrow 3)- \beta\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 4)- \beta\text{-D-Glcp}(1\rightarrow 2)- [\alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 3)]- \alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow 4)- \alpha\text{-D-GlcpA}(1\rightarrow .$

11. Polysaccharides selon la revendication 8, caractérisés en ce que lesdits polysaccharides sont sous forme d'hydrolysats de fractions de 5 000 daltons, purifiées ou en mélange.
12. Polysaccharides selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par fermentation d'une bactérie du genre *Klebsiella* dans un milieu nutritif comprenant une source de carbone, une source d'azote préférentielle et des sels minéraux, suivi d'un traitement thermique et d'une séparation.
13. Oligosaccharides, dérivés des polysaccharides selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils comportent au moins une molécule de rhamnose accessible en bout de chaîne ou fixée de manière ramifiée et en ce qu'ils sont majoritairement constitués de rhamnose.
14. Oligosaccharides selon la revendication 13, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par hydrolyse des polysaccharides selon l'une des revendications 1 à 11.
15. Oligosaccharides selon la revendication 14, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par hydrolyse du polysaccharide selon la revendication 6 et présentent un poids moléculaire de 5kDa ou 13kDa.
16. Oligosaccharides selon la revendication 14, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par hydrolyse du polysaccharide selon la revendication 10 et présentent un poids moléculaire de 5kDa.
17. Polysaccharides et/ou dérivés des polysaccharides selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils sont greffés sur des chaînes grasses de 6 à 30 atomes de carbone.
18. Composition cosmétique et/ou pharmaceutique en particulier dermatologique stimulant la libération de  $\beta$ -endorphines caractérisée en ce qu'elle contient au moins un composé actif de type polysaccharide et/ou un de ses dérivés selon l'une des revendications 1 à 17, seul ou en mélange avec un ou plusieurs excipient(s) ou véhicule(s) cosmétique(s) et/ou pharmaceutique(s) approprié(s).
19. Composition selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle contient entre 0.001% et 20% dudit polysaccharide et/ou dérivé, en poids.

20. Composition selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle contient entre 0.01% et 10% dudit polysaccharide et/ou dérivé, en poids.
21. Utilisation d'au moins un polysaccharide et/ou dérivé de celui-ci comportant des éléments répétitifs saccharidiques contenant au moins une molécule de rhamnose fixée de manière ramifiée et de préférence contenant majoritairement du rhamnose, comme agent cosmétique et/ou pharmaceutique, notamment dermatologique, stimulant la libération des  $\beta$ -endorphines.
22. Utilisation d'une composition telle que définie selon l'une des revendications 18 à 20 pour le soin des phanères et/ou de la peau en particulier des peaux sensibles.
23. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 18 à 20 pour le traitement cosmétique des réactions inconfortables de la peau et/ou des phanères.
24. Utilisation d'au moins un polysaccharide et/ou d'un dérivé selon l'une des revendications 1 à 17 pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter les réactions inconfortables et/ou soulager des douleurs de la peau et/ou des phanères par application topique.
25. Procédé de soin cosmétique, caractérisé en ce qu'il comprend l'application sur une zone de la peau et/ou des phanères concernée, d'un polysaccharide et/ou d'un dérivé défini selon l'une des revendications 1 à 17 éventuellement en mélange avec un ou plusieurs excipients ou véhicules cosmétiques appropriés.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00330

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08B37/00 A61K31/715 A61K35/74 C12P19/04 C12R1/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B A61K C12P C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 735 049 A (TAYCA CORP) 2 October 1996 (1996-10-02)  page 3, line 20 -page 4, line 47 page 10, line 14 -page 11, line 5; examples 9-11,30,31 ---	1-3,5,9, 12-16, 18-20
X	FR 2 624 522 A (BIOEUROPE) 16 June 1989 (1989-06-16) the whole document ---	1-7,9, 11-16
X	EP 0 775 490 A (TAYCA CORP) 28 May 1997 (1997-05-28) page 2, line 33 -page 5, line 13; example 1 page 9, line 52 - line 59 ---	1-5,9, 11-16
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 August 2003

Date of mailing of the international search report

22/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Contet, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00330

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 ADAM OLIVIER: "Complete NMR structural elucidation of the capsular polysaccharide adjuvant from klesiella I-714" Database accession no. prev199799324990 XP002251672 abstract &amp; EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 241, no. 2, 1996, pages 602-610, XP001154306</p>	1-7
A	<p>WO 02 03945 A (LHERMITE STEPHANE ;LVMH RECH (FR); BONTE FREDERIC (FR); DUMAS MARC) 17 January 2002 (2002-01-17) cited in the application the whole document</p>	1-25

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0735049	A	02-10-1996	JP 8256787 A	08-10-1996
			JP 8301904 A	19-11-1996
			JP 9013011 A	14-01-1997
			JP 9019633 A	21-01-1997
			JP 9031246 A	04-02-1997
			DE 69616852 D1	20-12-2001
			EP 0735049 A2	02-10-1996
			US 5989874 A	23-11-1999
FR 2624522	A	16-06-1989	FR 2624522 A1	16-06-1989
			EP 0320398 A2	14-06-1989
			JP 2138965 A	28-05-1990
			JP 5058715 B	27-08-1993
			US 4950604 A	21-08-1990
EP 0775490	A	28-05-1997	EP 0775490 A1	28-05-1997
			US 5760213 A	02-06-1998
			WO 9639155 A1	12-12-1996
WO 0203945	A	17-01-2002	FR 2811228 A1	11-01-2002
			AU 7569401 A	21-01-2002
			EP 1299081 A1	09-04-2003
			WO 0203945 A1	17-01-2002

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/00330

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C08B37/00 A61K31/715 A61K35/74 C12P19/04 C12R1/22

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C08B A61K C12P C12R

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 735 049 A (TAYCA CORP) 2 octobre 1996 (1996-10-02)  page 3, ligne 20 -page 4, ligne 47 page 10, ligne 14 -page 11, ligne 5; exemples 9-11,30,31	1-3,5,9, 12-16, 18-20
X	FR 2 624 522 A (BIOEUROPE) 16 juin 1989 (1989-06-16) le document en entier	1-7,9, 11-16
X	EP 0 775 490 A (TAYCA CORP) 28 mai 1997 (1997-05-28) page 2, ligne 33 -page 5, ligne 13; exemple 1 page 9, ligne 52 - ligne 59	1-5,9, 11-16
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 août 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/09/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Contet, F






C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1996 ADAM OLIVIER: "Complete NMR structural elucidation of the capsular polysaccharide adjuvant from klesiella I-714" Database accession no. prev199799324990 XP002251672 abrégé & EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 241, no. 2, 1996, pages 602-610, XP001154306	1-7
A	WO 02 03945 A (LHERMITE STEPHANE ;LVMH RECH (FR); BONTE FREDERIC (FR); DUMAS MARC) 17 janvier 2002 (2002-01-17) cité dans la demande le document en entier	1-25

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0735049	A	02-10-1996	JP 8256787 A	08-10-1996
			JP 8301904 A	19-11-1996
			JP 9013011 A	14-01-1997
			JP 9019633 A	21-01-1997
			JP 9031246 A	04-02-1997
			DE 69616852 D1	20-12-2001
			EP 0735049 A2	02-10-1996
			US 5989874 A	23-11-1999
FR 2624522	A	16-06-1989	FR 2624522 A1	16-06-1989
			EP 0320398 A2	14-06-1989
			JP 2138965 A	28-05-1990
			JP 5058715 B	27-08-1993
			US 4950604 A	21-08-1990
EP 0775490	A	28-05-1997	EP 0775490 A1	28-05-1997
			US 5760213 A	02-06-1998
			WO 9639155 A1	12-12-1996
WO 0203945	A	17-01-2002	FR 2811228 A1	11-01-2002
			AU 7569401 A	21-01-2002
			EP 1299081 A1	09-04-2003
			WO 0203945 A1	17-01-2002

**NOVEL AGENT FOR STIMULATING THE RELEASE OF BETA-ENDORPHINS,  
COSMETIC AND/OR DERMATOLOGICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME  
AND USES THEREOF**

**Patent number:** WO2004078789  
**Publication date:** 2004-09-16  
**Inventor:** LECLERE SOPHIE (FR); MOLINA JEAN-FRANCOIS (FR); LASSALLE LAURENT (FR); PHILBE JEAN-LUC (FR)  
**Applicant:** SOLABIA SA (FR); LECLERE SOPHIE (FR); MOLINA JEAN-FRANCOIS (FR); LASSALLE LAURENT (FR); PHILBE JEAN-LUC (FR)  
**Classification:**  
- **International:** C08B37/00; A61K31/715; A61K35/74; C12P19/04; C12R1/22  
- **European:** A61K8/73; A61K31/715; A61Q17/04; A61Q19/00; C08B37/00P; C12P19/04; C12R1/22  
**Application number:** WO2003FR00330 20030204  
**Priority number(s):** WO2003FR00330 20030204

**Cited documents:**

 EP0735049  
 FR2624522  
 EP0775490  
 WO0203945  
 XP002251672

**Report a data error here**

**Abstract of WO2004078789**

The invention relates to the field of essential goods, particularly the fields of cosmetics and pharmaceuticals and, more specifically, dermatology. In particular, the invention relates to novel active compounds which stimulate the release of beta -endorphins by keratinocytes, consisting of a polysaccharide and/or a saccharide derivative comprising repeating saccharide units containing at least one rhamnose molecule which is fixed in a branched manner, said sequence preferably comprising mainly rhamnose. The invention also relates to the use of such polysaccharide compounds in order to stimulate the release of beta -endorphins by keratinocytes. The invention further relates to cosmetic and/or pharmaceutical compositions, particularly dermatological compositions, containing the inventive active compound which may be used together with or in a mixture with one or more suitable pharmaceutical and/or cosmetic vehicles or excipients. The aforementioned compositions can be used, for example, to care for and/or treat the skin and/or skin appendages.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide